平成25年6月12日　第23回レジオネラ対策シンポジウム

ATP測定による浴場衛生管理法（に向けて）

水中法（液中法）による
パイロット的測定事例報告（その1）

【ご協力】
ATP・迅速検査研究会　事務局殿
会員会社理事様

NPO入浴施設衛生管理推進協議会
ATP分科会　堀川　有　小彈正公彰
玄地　学　中島　有二　石谷　道夫

NPO入浴協（入浴施設衛生管理推進協議会）
無断転用不可・無断複製・不許複製

はじめに（浴槽水のATPのお話を進める前に）

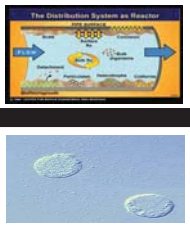
- ATP-RLU（ Relative Light Unit ）読み値≠微生物量
- RLU読み値＝ATP量（ $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ 分子量507 ）だとは、一概には言えない
- ATPは、共存の物質等により阻害を受けていることがある
- ATP-RLU読み値は、「水質＋蛋白質＋微生物」由来の総量
- 入浴環境中の微生物量や種類を知る方法では無い
- ATP測定器には、検出限界がある
- ATP量1pmol（10^{-12}mol）/SWAB＝相対発光量1000RLU読み値
- ATP-RLU読み値解釈に誤解や齟齬を生じさせない
- 100以下RLU読み値をどの様に捉えるのか、評価するのか

入浴施設へのATP迅速検査適用　まとめ

前回、22回Lpシンポ

モニター

（浴槽水水質基準／細菌）
・レジオネラ属菌：検出されないこと（10cfu/100ml未満）
・大腸菌群：1個/ml以下であること



（常に細菌増殖条件が揃う）
・バイオフィルムの存在
・アメーバの侵入
・汚れ（栄養源）や鉄の存在

検証と再現性

有効性大

（ATP迅速検査方法）
・ふき取り（スワブ）方法
・水中（リキッド）方法

（ATP迅速検査導入）
10数秒で、汚染度＝清浄度が確認され、常に清潔さを整えられる

（洗浄と消毒及び日常業務習慣）
・適切な洗浄や清掃の実施
・十分な消毒効果発揮
・円滑化（高効率）

HACCP的

予測と予防

（ご利用者様の健康）
・ご利用者様の安全衛生性確保
・施設の健全性維持
・経済性効果

NPO法人衛協（入浴施設衛生管理推進協議会）　不許複製・無断転用不可

目的（どちらかと言うと定性的に近いかも）

- Lp属菌の消毒効果阻害や増殖条件の一つに、「BF（バイオフィルム）」の存在がある。
- 浴槽水や入浴施設の清浄度負荷に、ネガティブに係わっているのが「BF」である。
- そこで、水中法器材にて、「BF」の時系列的な成長増殖具合をATP相対発光量（RLU）で読んでみよう。（読めるものなら・・）
- 「BF」とそのATP相対発光量（RLU）側から、清浄度の管理基準等設定につながるか等の仮説を検証してみよう。
- どの位から、蛋白質が検出してくるのかも確認してみよう。

どんな現場！

- 場所：茨城県高萩市　手綱（てづな）温泉
- 対象温泉：（1）ナトリウム―硫酸塩泉（旧泉質名：芒硝泉）
  （2）硫黄泉（旧泉質名：硫化水素泉）
- 現場（ATP測定）写真

NPO 浴衛協（入浴施設衛生管理推進協議会）
不許複製・無断転用不可

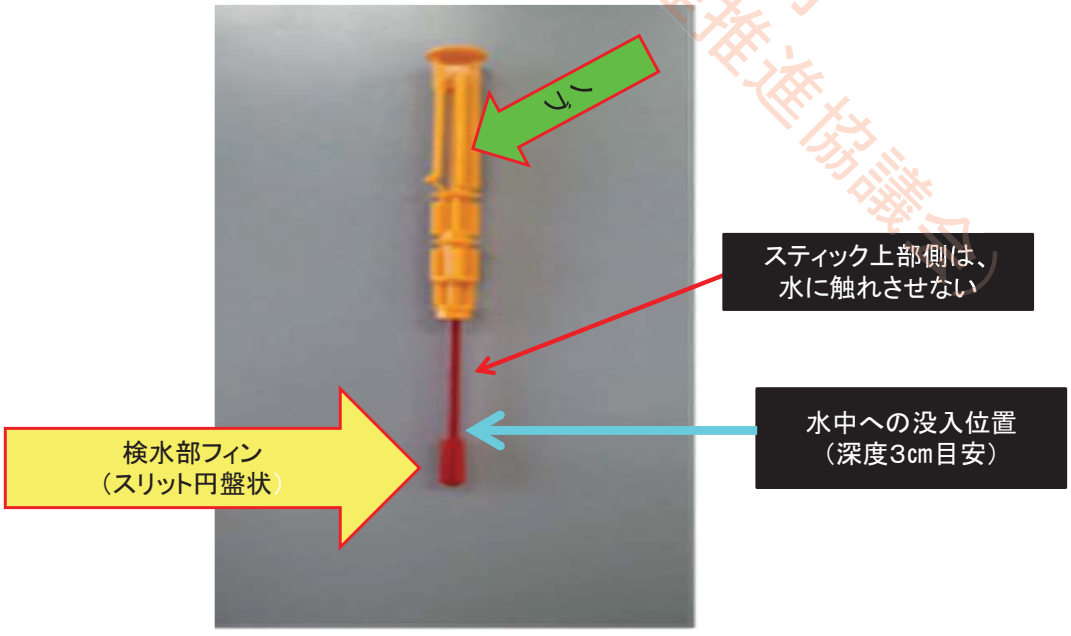
材料

- 水中法（液中法）ATP試薬：ルシパックpen-AQUA（検水部に界面活性剤無しのABS樹脂製無垢材である。計算上の採取検水容量0.15ml、表面積6.3㎠の仕様）
- 測定器：ルミテスターPD-20型
- 阻害試験試薬：ルシフェールATP標準試薬セット
- SWAB（拭き取り）ATP試薬：ルシパックpen
- 残蛋白質検出試薬：クリーントレースPRO50とCIT50
- 分析用器材試薬類：1式
- SWABと残蛋白質試験器材：ABS樹脂板（設定面積100㎠）
- 同上比較材質器材：PVC-C配管、EPDM及びPTFEパッキン
- その他用具器材等：1式

水中ATP測定法（実験使用器①）

ｷｯｺｰﾏﾝﾊﾞｲｵｹﾐﾌｧ(株)製ルシパックPen-AQUA

界面活性剤無添加のABS樹脂製フィン（検水部）



NPO 法人 入浴施設衛生管理推進協議会
不許複製・無断転用不可

SWAB（拭き取り）ATP測定法（実験使用器②）

ABS樹脂板

試薬 ｷｯｺｰﾏﾝﾊﾞｲｵｹﾐﾌｧ(株)ルシパックPen

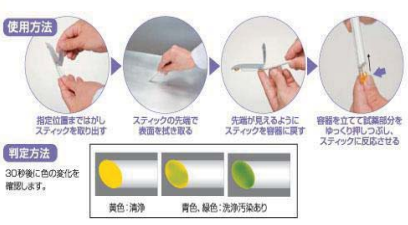
無断転用不可・無断複製・無断転用禁止（入浴施設衛生管理推進協議会）

残蛋白質試験（実験使用器③）

感度：50μg/100㎠以上

試薬 ｽﾘｰｴﾑﾍﾙｽｹｱ(株)

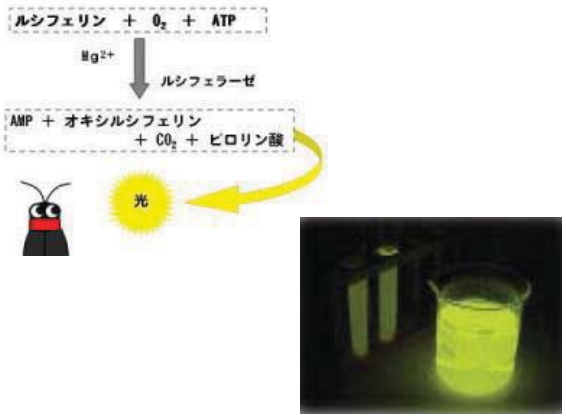
3M クリーントレース
PRO50とCIT50



試薬類

NPO法人日本環境衛生センター（入浴施設衛生管理推進協議会）
無断転用不可・無断複製

さて、おさらいですが、ATP測定法（原理）は、



キッコーマンバイオケミファ(株)殿HPから引用

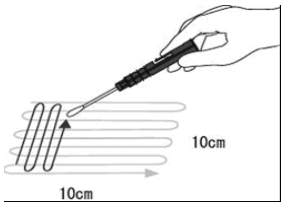
- ATPはすべての生物体のエネルギー源
- ルシフェラーゼ（酵素）と反応すると発光する。
- 発光量を数十秒で確認できる。
- 食品衛生や医療機関で利用されている。

ATP測定器と測定法種類

- 各メーカーの簡易測定器が流通している。
  キッコーマンバイオケミファ(株)
  ニッタ(株)
  スリーエムヘルスケア (株)
  エア・ブラウン(株)…等から発売

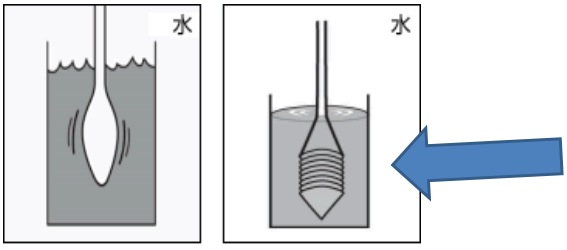
・本体価格は10万円前後
・試薬はセット価格

- ふき取り検査（SWAB法）



キッコーマンバイオケミファ(株)殿HPから引用

- 水中ATP検査（液中法）



ニッタ(株)殿HPから引用

NPO法人衛協(入浴施設衛生管理推進協議会)
不許複製・無断転用不可

水中法（液中法）測定器メーカー機種（ハンディタイプ）

エア・ブラウン(株)

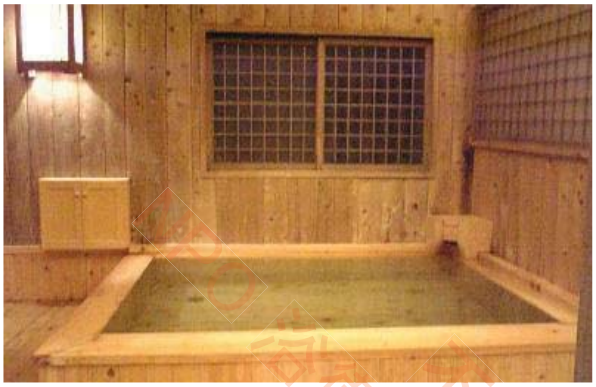
ｷｯｺｰﾏﾝﾊﾞｲｵｹﾐﾌｧ(株)

ｽﾘｰｴﾑﾍﾙｽｹｱ(株)

ニッタ(株)

実験箇所（茨城県内の温浴施設）

①ナトリウム－硫酸塩泉



毎分150ﾘｯﾄﾙ（９㎥/Hr） 自噴泉　32℃

②硫黄泉

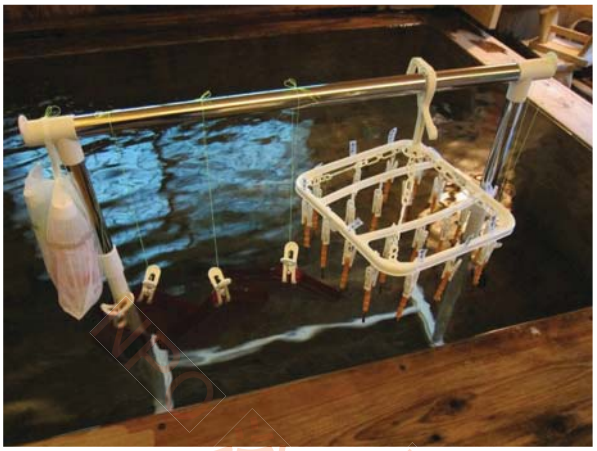
毎分3000ﾘｯﾄﾙ（180㎥/Hr） 自噴泉　19℃

©ATP分科会（入浴施設衛生管理推進協議会）　不許複製・無断転用不可

実験方法

- ATP分科会討議にて、実験プロトコル並び仕様書を作成した
- 水中法（液中法）を主体かつナトリウム-硫酸塩泉を主体
- 対照にSWAB（拭き取り）数値の変動比較
- 残蛋白質拭き取り定性数値で、蛋白質汚染を知る
- 対象の温泉水からのATP阻害数値を分析する
- 各測定方法や操作は、取扱説明書に従う
- 時系列での検出数値を記録する
- 入浴前と入浴後の変化を知る

現場（実験の浴槽とピット）



（ナトリウム - 硫酸塩泉）
浴槽容量1.9㎥　かけ流し量32ℓ/分
浴槽水滞留時間数1Hr

（硫黄泉）
ピット容量1.1㎥　かけ流し量3000ℓ/分

不許複製・無断転用不可（浴槽協（入浴施設衛生管理推進協議会））

時系列設定（ナトリウム-硫酸塩泉）

	AQ1	AQ2	平均	SWAB	残蛋白質
ブランク					
30秒後					
1分後					
5分後					
30分後					
1時間後					
2時間後					
4時間後					
6時間後				※	※
8時間後					
12時間後				※	※
16時間後					
20時間後					
24時間後				※	※
24時間後	—	—	—	PVC、EPDE、PTFE	PVC、EPDE、PTFE
阻害試験					

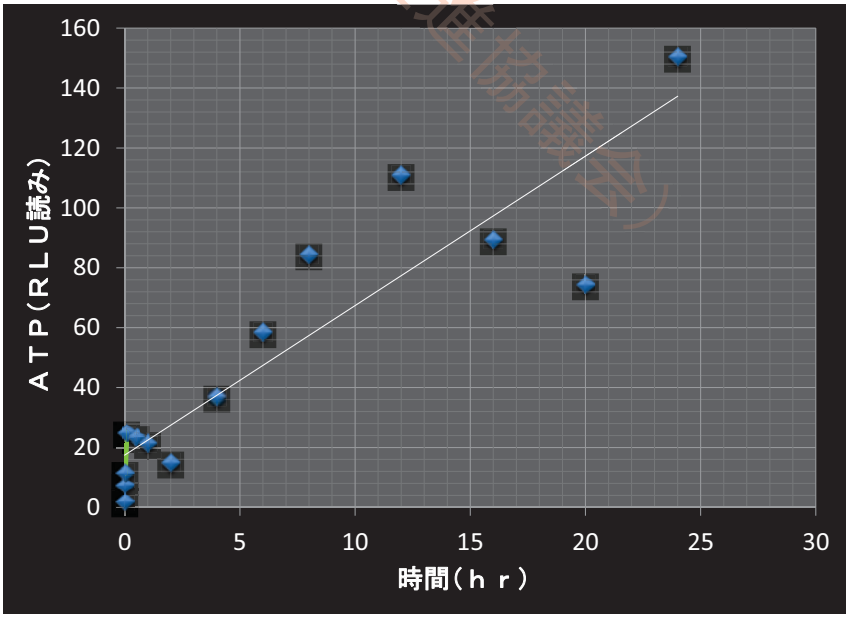
時系列設定（硫黄泉）

	AQ1	AQ2	平均	SWAB	残蛋白質
ブランク					
30秒後					
1分後					
5分後					
30分後					
1時間後					
6時間後				※	※
12時間後				※	※
24時間後				※	※
24時間後	—	—	—	PVC、EPDE	PVC、EPDE
阻害試験					

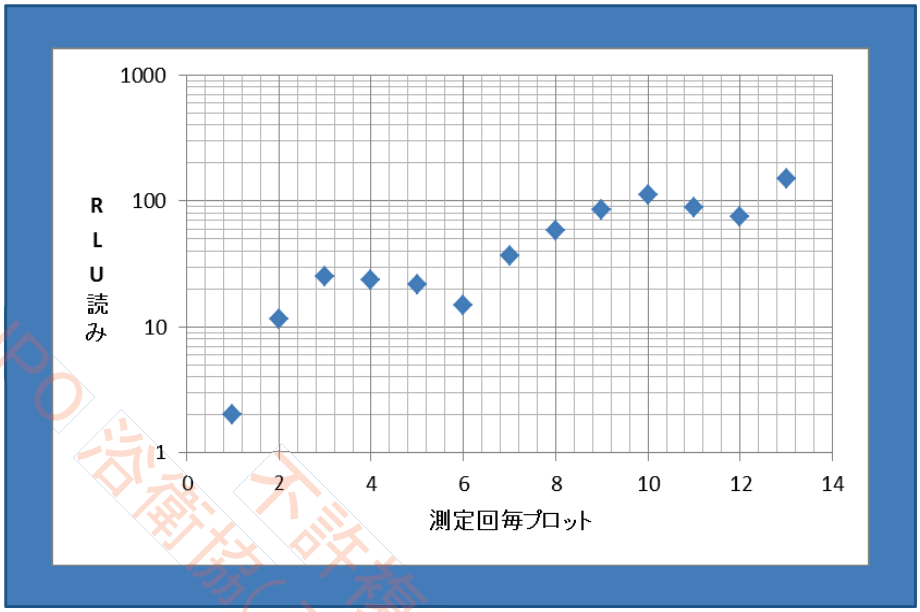
不許複製・無断転用不可
(一社)浴衛協(入浴施設衛生管理推進協議会)

実験結果（ナトリウム－硫酸塩泉）

	ATP（RLU読み平均）
ブランク	7.5
30秒後	2.0
1分後	11.5
5分後	25.0
30分後	23.5
1時間後	21.5
2時間後	15.0
4時間後	37.0
6時間後	58.5
8時間後	84.5
12時間後	111.0
16時間後	89.5
20時間後	74.5
24時間後	150.5



漸増傾向（半対数）／ナトリウム-硫酸塩泉



NPO浴衛協(入浴施設衛生管理推進協議会) 不許複製・無断転用不可

（隣の浴槽で）ヒト入浴前後のATP-RLU読み値変化

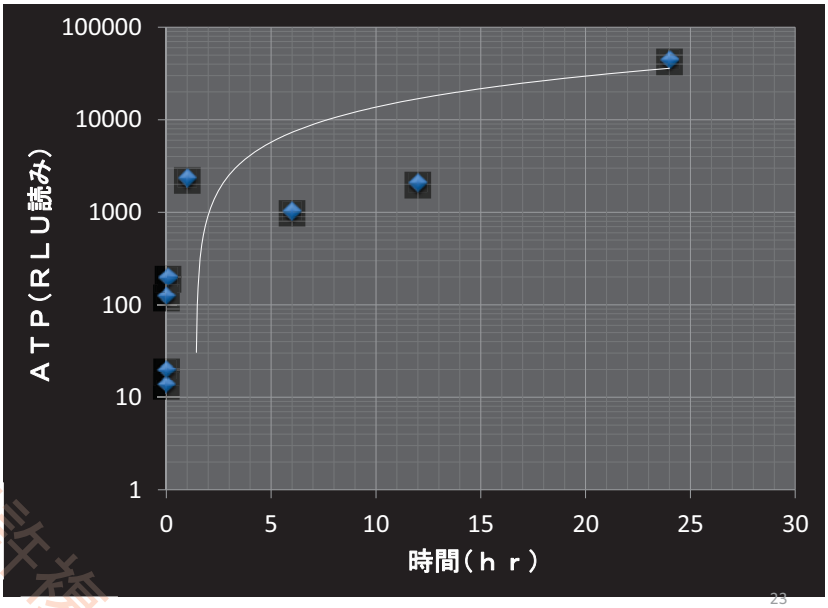
入浴前のATP-RLU読み値	入浴後のATP-RLU読み値（男3名入浴）
2	14
	30分経過後に測定（浴槽水換水率50%。約1㎥オーバーフロー排水）。消毒剤なし。浴槽水温度約40℃（加温）。

（現象から）
浴槽水のATP増加（持込み）は、ヒト（入浴者）からが約90%だと断定できる。即ち、微生物由来では無いとの推定が成り立つ。しかし、数値の精度性（試薬感度等と含め）は検証必要。

市販精製水ATP-RLU読み値	3
水道水（高萩市水）	2

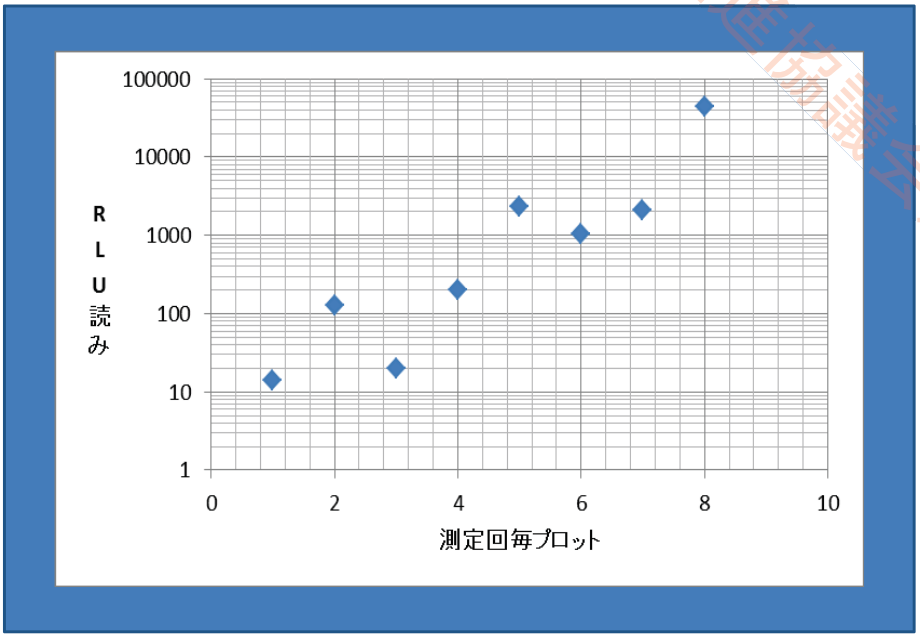
実験結果（硫黄泉）

	ATP（RLU読み平均）
ブランク	14
30秒後	126.5
1分後	20
5分後	201
1時間後	2364.5
6時間後	1033
12時間後	2092.5
24時間後	44863



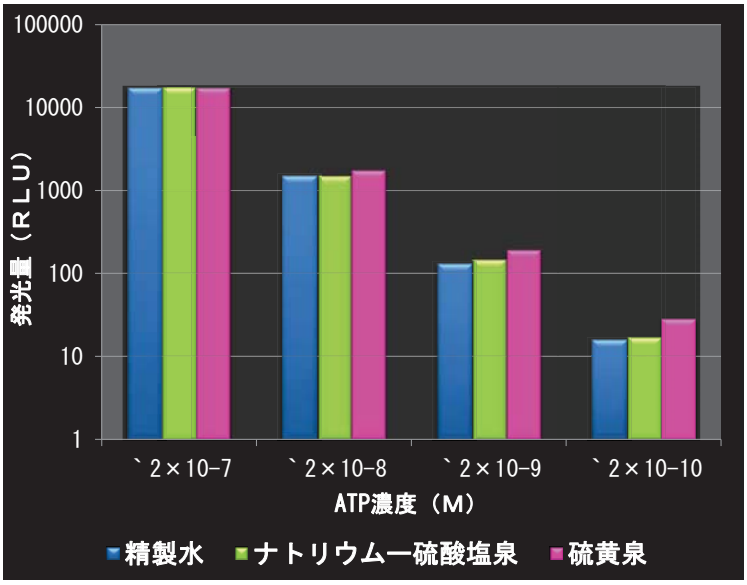
MPO 浴衛協(入浴施設衛生管理推進協議会)
不許複製・無断転用不可

漸増傾向(半対数)／硫黄泉



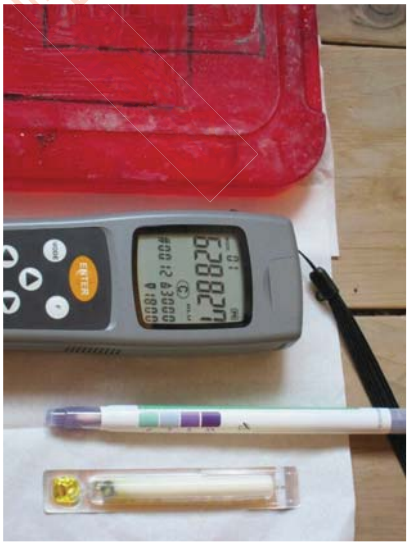
阻害試験の結果

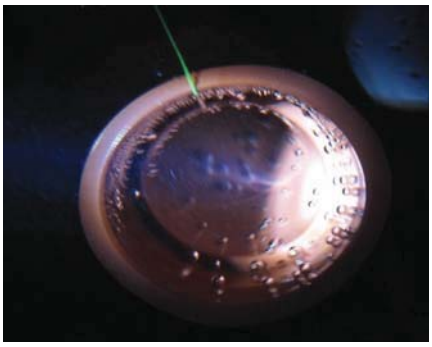
ＡＴＰ濃度（M）	精製水（RLU読み）	ナトリウム－硫酸塩泉（RLU読み）	硫黄泉（RLU読み）
2×10^{-7}	17236	17519	17233
2×10^{-8}	1504	1488	1742
2×10^{-9}	132	146	192
2×10^{-10}	16	17	29



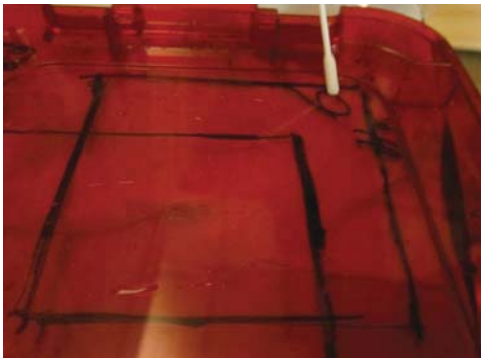
不許複製・無断転用不可
入浴施設衛生管理推進

SWABデータ





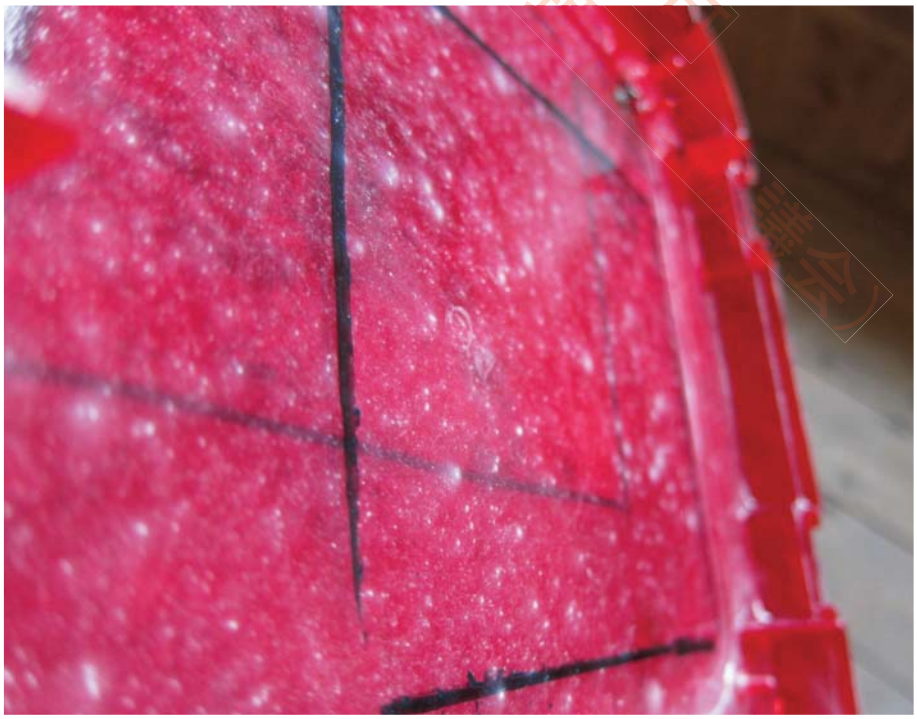
経過時間と共に
気泡が表面付着



ナトリウム-硫酸塩泉

NPO 浴槽水循環装置・無断転用不可
NPO 浴槽水循環入浴施設衛生管理士講習会

付着成長のＢＦ外観（硫黄泉）



NPO 法人 無断複製・無断転用不可 入浴施設衛生管理推進協議会

BF成長に関する参考

- まず、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）が30秒で定着
- 大腸菌は30分で二分裂増殖
- 1ppb有機質存在下で約9500個/mlの細菌数
- 従属栄養細菌による形成
- 出典「*Nature* **497**, 7449　2013年5月16日」Microbiology: Bacterial communities as capitalist economies（バイオフィルムは「金持ちはさらに金持ちに」型の仕組みによって作られる：べき乗則の様な運動性を与えて増えて行く）
- 極微量の硫化水素（H_2S）は、細胞の生理活性物質

SWAB試験の時系列結果との比較（ナトリウム-硫酸塩泉）

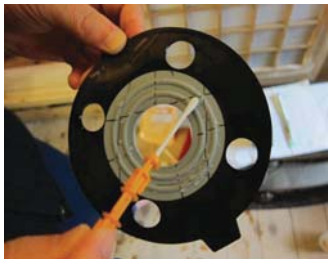
ナトリウム-硫酸塩泉	表面積（㎠）	時系列単位時間数	RLU読み値（平均）	単位面積当たり換算RLU読み値（6.3／100㎠）
ルシパックpen-AQUA	6.3	6時間後	54～63（58.5）	
		12時間後	89～133（111）	
		24時間後	127～174（150.5）	
ABS樹脂板	100	6時間後	930	58.6
		12時間後	1453	91.5
		24時間後	1791	112.8

①小表面積のルシパックpen-AQUAでのATP-RLU読み値を、BF成長量に仮定すると、平面樹脂版表面成長と比較しても、遜色はないと読取れる。
今後、検体数を増やして、結果や相関性を確認したい。（面積比1：16）
②また、相関性が見られれば、検水部フィンや一定面積テストピースの単位時間水中没入方法モニタリングにおけるBF成長度合いから、浴槽水汚染度（清浄度）を推定できる可能性があり、衛生管理上の迅速措置につながる。

NPO法人 浴槽水管理技術研究会 無断転用不可 無断複製・無断転用不可 浴槽水入浴施設衛生管理推進協議会

SWAB試験結果と残蛋白質結果

ナトリウム-硫酸塩泉	材質	ATP-RLU読み値	残蛋白質判定
6時間経過後（5月9日21：26）	ABS板	930	緑（セーフ、50μg/100㎠以下）
12時間経過後（5月10日03：26）	ABS板	1453	緑（セーフ、50μg/100㎠以下）
24時間経過後（5月10日15；26）	ABS板	1791	青灰（汚染、50μg/100㎠以上）
	PVC-C配管	2794	青灰（汚染、50μg/100㎠以上）
	PTFEパッキン部	269	緑（セーフ、50μg/100㎠以下）
	EPDMパッキン	1357	緑（セーフ、50μg/100㎠以下）



硫黄泉	材質	ATP-RLU読み値	残蛋白質判定
19時間経過後（5月10日10；48）	ABS板	628827	濃紫（強汚染、300μg/100㎠以上）
24時間経過後（5月10日15；26）	ABS板	929185	濃紫（強汚染、300μg/100㎠以上）
	PVC-C配管	266363	紫（汚染、100μg/100㎠以上）
	EPDMパッキン	748197	紫（汚染、100μg/100㎠以上）

不許複製・無断転用不可
浴衛協（入浴施設衛生管理推進協議会）

分ったことと推定されること

①時系列的にATP-RLU読み値は上昇しており、2log（100RLUクラス）以上検出は、端的なBF成長をうかがう。
②3log（1000RLUクラス）以上検出は、要注意の汚染レベルに向かっていると考えるが、その時の浴槽水検出数値は非常に小さく0～2の数値であった。
③2000RLUに近づくと、残蛋白質を検出（濃度50μg/100㎠以上）し、蛋白質汚染が顕著に現れる。
④浴槽保有水量1.9㎥に32ℓ/分当たりの源泉補給を行い、実験温泉水量合計1.9㎥ ×24Hr＝45.6㎥において、水量1㎥当たり換算で、ナトリウム-硫酸塩泉3.3RLU/㎥であった。また、硫黄泉は温泉水量合計180㎥ ×24Hr＝4320㎥ において、水量1㎥当たり換算で10.4RLU/㎥であった。
⑤また、単位時間当たり換算では、ナトリウム-硫酸塩泉6.27RLU/Hr・日、硫黄泉1869.3RLU/Hr・日であった。

⑥補給される温泉水の成分（従属栄養或いは単独栄養）が、ATP-RLU数値とBF成長に影響している。
⑦源泉或いは源泉タンク水のベースATP-RLU読み値をその都度、測り記録し、浴槽水読み値と比較することで、汚染進行度が掴めると考える。
⑧水中法での測定検水時には、試料水（50～100ml位）を強くシェークしてから用いれば（気泡は収めてから）、水中の浮遊BFがより細かく分散されて、検水部フィンに捕捉され易くなる可能性があり、水中そのもののATP-RLU読み値に正確性が増すと推定する。
⑨ヒトが入浴するとATP-RLU読み値が増加して検出された。また、入浴者数が多いほどにヒト由来のATP量も上昇すると推定する。
⑩運転稼動下、BFは成長している。が、瞬間的に採取の水中だけのATP-RLU（ATP10^{-14}molクラス）読み値は浴槽水全貌の数値を指してはいない。
⑪新泉質名（25細分化種類）毎の試験とその都度のブランク試験が必要。
⑫ATP阻害試験は必須。水質と消毒剤影響の有無を把握して反映させる。

不許複製・無断転用不可
（一社）日本浴槽衛生・入浴施設衛生管理推進協議会）

導入に向けての課題まとめ

水中法ATP-RLU読み値運用（自主管理基準）までの道程ピックアップ		
源泉（11大別、25細分化泉質）	源泉タンク水（貯湯槽）	水道水（地下水、河川水）
浴槽水	源泉置換水（補給）率	給湯水
利用者数（入浴者数）	利用者性別・年齢別	測定ポイント
季節性変動	温泉（水質）阻害率	消毒（方法）阻害率
測定試験期間4～6週間	試験運用（パイロット的運転）	病原性微生物のATP量
安全衛生性の確認	清浄度試験方法確定	※　検証と再現性　※
自主管理基準設定と試運転	本格的運用	その他検討事項

今回試験からのATP水中法（液中法）知見と可能性

ATP5点
チェック
データ化

最低限

1、源泉（水道水）の数値

2、源泉貯槽（給湯槽）の数値

3、水質阻害性の数値

4、営業中浴槽水の数値

5、消毒剤投入後の数値

【絶対的基本】
洗浄清掃工程

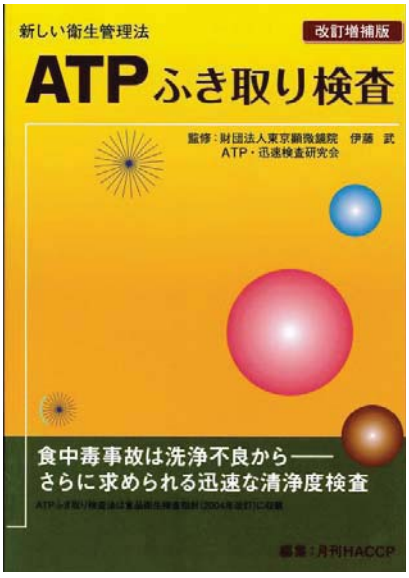
（現場で即判明する分析試験と補完関係）
1、水中法ATP測定（RLU読み）
2、消毒剤（物質）濃度測定
3、残蛋白質測定
4、SWAB-ATP測定（RLU読み）
5、源泉と浴槽水pH、ORP、EC

安全率
5倍

【浴槽水品質】
清浄度（保証）
安全性（担保）

NPO法人日本入浴施設衛生管理推進協議会
無断転用不可・無断複製

まとめ



ナトリウム－硫酸塩泉

- 時間経過と共にATP-RLU読み値の増加が漸増して見られた
- 泉質からの炭酸気泡が表面に付着保持されて、BFが着きにくい傾向にあると予想される

硫黄泉

- 湯ノ花のATP-RLU読み値が高濃度
- 検出される数値が大きいことから、変化動向が判り易い
- 湯ノ花の巻き込み有無次第で、ATP-RLU読み値の変動が極めて大きく現れた

今後の方向

- それぞれの泉質でのATP-RLU読み値とLp属菌有無との関係及びBF構成菌の同定
- 入浴者や消毒剤の存在下でのATP-RLU読み値測定及び補正数値情報
- BFとLp属菌コロニーのATP-RLU読み値測定低い読み値（99RLU以下）とATP濃度の判断
- 泉質の数（例：新泉質名25区分）だけの個別管理基準値の検討
- 新実験計画仕様の検討

ご清聴ありがとうございます。

無許複製・無断転用不可
NPO 浴衛協(入浴施設衛生管理推進協議会)